



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 198 56 777.4

Anmeldetag: 30. November 1998

Anmelder/Inhaber: Max Zeller & Söhne AG, Romanshorn/CH

Bezeichnung: Anti-Petasin-Antikörper, Verfahren zu ihrer
Herstellung und ihre Verwendung

Priorität: 30.10.1998 DE 198 50 011.4

IPC: C 07 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Anti-Petasin-Antikörper, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Anti-Petasin-Antikörper zum Nachweis von Petasin oder Petasin-Protein-Konjugaten in physiologischen Flüssigkeiten, die keine Kreuzreaktivität gegenüber Derivaten, Strukturanaloga oder Metaboliten des Petasins besitzen, Verfahren zu ihrer Herstellung mittels Immunisierung durch Petasin-Derivate, die vorzugsweise Carrier-Molekül-gekoppelt sind sowie ihre Verwendung und einen Testkit.

Petasin, eine Komponente von Pestwurzextrakten, ist bekanntermaßen der Ester aus Petasol und Angelikasäure, der schon länger als pflanzliches Spasmoanalgetikum zur Bekämpfung von Spasmen des Gastrointestinaltraktes, insbesondere Harnleiterkoliken, spastischen Bronchitiden und Migräne, sowie antiphlogistisch verwendet wird (B. Debrunner et al., Pharm. Acta Helv. 72, 359-380 (1998)). Weiterhin schreibt man Petasindrogen eine Antitumorwirkung zu (B. Meier et al., Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 5. Auflage, S. 81-105, Springer-Verlag (1994)). Inzwischen liegen auch neuere Erkenntnisse zur Beeinflussung der Biosynthese von Leukotrienen vor (D. Pichl et al., Planta Medica, 60, 318-322 (1994)).

Nach peroraler Applikation von Petasindrogen sind in Körperflüssigkeiten gesunder Probanden lediglich Konzentrationen im Bereich von wenigen ng/ml zu erwarten. Vor diesem Hintergrund sind biologische, physikalische und chemische Nachweisverfahren, die zur Charakterisierung der Droge selbst Anwendung finden, für die Quantifizierung von Petasin in Körperflüssigkeiten nicht anwendbar. Selbst moderne analytische Methoden, wie die üblicherweise angewendete HPLC, sind nicht ausreichend empfindlich bzw. aufgrund ihres hohen Zeitaufwandes für große Probenzahlen nicht geeignet.

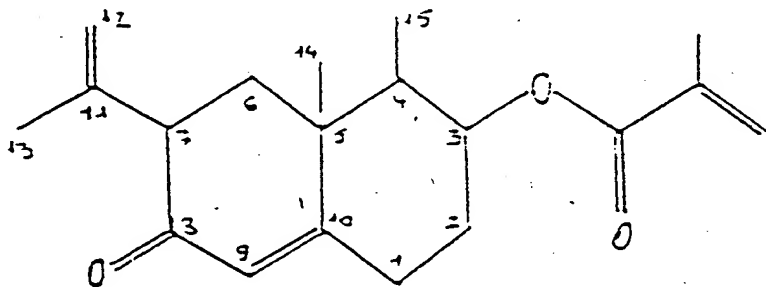
Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde Nachweismethoden für Petasin bereitzustellen, insbesondere für die gewünschten pharmakokinetischen Untersuchungen geeignete Methoden mit hoher Sensitivität und Spezifität.

Erfindungsgemäß erfüllen immunchemische Detektionstechniken die gestellten Anforderungen an Sensitivität und Spezifität, wodurch eine zusätzliche, der eigentlichen Bestimmung vorangehende Extraktion bzw. Konzentrierung der Probe, wie sie bei chromatographischen Verfahren erforderlich ist, entfällt.

Die Lösung der Aufgabe konnte durch Bereitstellung von Anti-Petasin-Antikörpern, die insbesondere keine Kreuzreaktivität gegenüber Derivaten, Strukturanaloga oder Metaboliten des Petasins besitzen, realisiert werden.

Die erfindungsgemäßen Antikörper werden mit Derivaten des Petasins hergestellt, die vorzugsweise an ein Carrier-Molekül gekoppelt sind. Überraschend konnte dadurch die Herstellung von Antikörpern gegen die Kopplungsgruppe des Petasins bzw. eine möglicherweise eintretende Veränderung des in der Nähe der 8-Position liegenden immundominanten Epitops vermieden werden.

Die polyklonalen oder monoklonalen Antikörper werden durch Immunisierung von Säugetieren und/oder Vögeln mit Petasin oder Petasin-Derivaten der allgemeinen Formel I



5

hergestellt und über Hybridomtechnik oder rekombinant mit Hilfe von Antikörperbibliotheken gewonnen.

Vorzugsweise werden folgende Carrier-Molekül-gekoppelten Derivate eingesetzt:

- Derivate des Petasins der allgemeinen Formel I, in denen die in 8-Stellung befindliche Ketogruppe durch eine Carboxylgruppe ersetzt und mittels EDAC an Rinderserumalbumin gekoppelt ist.
- Derivate des Petasins der allgemeinen Formel I, in denen die in 8-Stellung befindliche Ketogruppe durch eine Carboxylgruppe ersetzt und über aktiviertes Hydrazid-Dextran an Rinderserumalbumin oder Fibrinogen gekoppelt ist, wobei die Einführung der Carboxylgruppe bevorzugt mit Carboxymethylhydroxyamin unter Oximbildung erfolgt.
- Derivate des Petasins der allgemeinen Formel I, in denen die in 11,12- Stellung befindliche Doppelbindung bromiert und an mittels Trauttschem Reagenz aktiviertes Rinderserumalbumin gekoppelt ist.
- Derivate des Petasins der allgemeinen Formel I, in denen die Angelikasäure abgespalten ist und das verbleibende Petasol über Chlorameisensäureester an einen Träger gekoppelt ist.

Die so hergestellten Anti-Petasin-Antikörper besitzen keine Kreuzreaktivität gegenüber Derivaten, Strukturanaloga oder Metaboliten des Petasins und werden zum Nachweis von Petasin oder Petasin-Protein-Konjugaten in physiologischen Flüssigkeiten eingesetzt, wobei entweder Petasin, Petasin-Protein-Konjugate oder die Anti-Petasin-Antikörper vorzugsweise mit einem Marker versehen sind. Bevorzugt liegen die Reaktionspartner in homogener Lösung vor.

Als Marker werden Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe, Radioisotope oder redoxaktive Verbindungen verwendet.

Das antikörpergebundene Petasin wird optisch, elektrochemisch, fluorimetrisch oder radiochemisch nachgewiesen, bevorzugt optisch mittels Farbreagenzien oder chromatographisch.

6

4 1 9 8

In einer Ausführungsvariante werden entweder die Anti-Petasin-Antikörper, das zu bestimmende Petasin oder die Petasin-Protein-Konjugate an eine feste Phase gebunden, wobei zwischen den Reaktionsschritten ein Waschprozeß erfolgt.

Die feste Phase ist ggf. chemisch aktiviert, wobei die Bindung der Anti-Petasin-Antikörper, des zu bestimmenden Petasins oder der Petasin-Protein-Konjugate daran adsorptiv oder kovalent erfolgt. Besonders bevorzugt wird als feste Phase Polystyren verwendet.

Darüber hinaus kann die feste Phase eine unterschiedliche geometrische Form aufweisen, so z.B. in Form einer Mikrotitrationsplatte, eines Röhrchens oder in kugelförmiger bzw. flächenförmiger Gestalt.

Desweiteren betrifft die Erfindung einen Testkit zur Bestimmung von Petasin in physiologischen Flüssigkeiten, der umfaßt

- Anti-Petasin-Antikörper
- eine feste Phase, vzw. Polystyren
- Waschlösung,
- Verdünnungspuffer,
- markiertes Petasin oder einen markierten Anti-Species-Antikörper,
- ein markerspezifisches Nachweissystem, vorzugsweise ein Enzymsubstrat.

Anschließend wird die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

A) Herstellung der Immunogene

Petasinnoxim:

10 mg ($3,3 \times 10^{-5}$ mol) Petasin in 5 ml Ethanol lösen, mit 15 mg ($6,8 \times 10^{-5}$ mol) Carboxymethoxylamin Hemihydrochlorid (Sigma-

47

Aldrich) versetzen und tropfenweise 5 M Natronlauge bis zu einem pH von 12 zugeben. Der Ansatz wird 4 h am Rückfluß erhitzt, auf dem Wasserbad zur Trockne eingengt, mit 2 M Salzsäure gewaschen und in einem Gemisch aus 1 ml Dioxan und 2 ml DMSO gelöst und bei - 70 °C gelagert.

Dünnschichtchromatografie: R_f-Wert (Kieselgel G60, Chloroform) = 0,42 (Petasin: 0,16).

Das Oxim entsteht als alleiniges Reaktionsprodukt.

Petasinnoxim-Rinderserumalbumin:

32 mg ($4,8 \times 10^{-7}$ mol) Rinderserumalbumin (RSA) in 4 ml PBS lösen (Lösung A).

7 mg ($1,8 \times 10^{-5}$ mol) Petasinnoxim, gelöst in 1 ml Dioxan/DMSO = 1:2 (v/v), mit 16 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) versetzen und unter Rühren 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen (Lösung B). Lösung B tropfenweise zu Lösung A geben und 6 h bei Raumtemperatur rühren, anschließend bei 4 °C gegen 3x0,5 l PBS (0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl, pH=7,4) dialysieren und bei - 70 °C lagern.

Petasin-Dextran-Proteine:

7 mg ($1,8 \times 10^{-5}$ mol) Petasinnoxim, gelöst in 1 ml Dioxan/DMSO = 1:2 (v/v) tropfenweise zu 32 mg Rinderserumalbumin ($4,8 \times 10^{-7}$ mol) bzw. Fibrinogen in 4 ml PBS geben und mit 0,5 mg ($1,5 \times 10^{-4}$ mol Hydrazidgruppen) aktiviertem Hydrazid-Dextran (Pierce, Code 20900) versetzen. Danach werden 16 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) hinzugefügt und das Gemisch 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird bei 4 °C gegen 3x0,5 l PBS (0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl, pH=7,4) dialysiert. Die Lagerung erfolgt bei - 70 °C.

Brompetasin-Rinderserumalbumin:

Bromierung von Petasin:

10 mg ($3,3 \times 10^{-5}$ mol) Petasin, gelöst in 3 ml Dichlormethan,

werden tropfenweise unter Schwenken mit 5 mg ($3,1 \times 10^{-5}$ mol) Brom in 1 ml Dichlormethan versetzt. Der Ansatz wird danach im Wasserbad zur Trockne eingengt und in 1 ml DMSO aufgenommen. Dünnschichtchromatografie: R_f -Wert (Kieselgel G60, Chloroform) = 0,51 (Petasin: 0,16).

Thiolierung von Rinderserumalbumin:

40 mg (6×10^{-7} mol) Rinderserumalbumin in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH=8,0 lösen und mit 20 mg ($1,4 \times 10^{-4}$ mol) 2-Iminothiolan-Hydrochlorid (Traut's Reagenz) versetzen und 40 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Anschließend wird mit Hilfe einer mit Sephadex G25 gefüllten Säule (1x10 cm) gegen 0,1 M Phosphatpuffer pH=7,2 umgesalzt. Zur Lösung des thiolierten Proteins gibt man unter Rühren 4 mg ($8,4 \times 10^{-6}$ mol) Brompetasin und läßt 3 h bei Raumtemperatur inkubieren, worauf bei 4 °C gegen 3x0,5 l PBS (0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl, pH=7,4) dialysiert wird.

Petasol-Rinderserumalbumin:

0,7 mg ($2,9 \times 10^{-6}$ mol) Petasol werden in 200 µl getrocknetem Dioxan/DMF = 1:1 (v/v) gelöst, mit 2 mg ($7,9 \times 10^{-6}$ mol) 5-Norbornen-2,3-dicarboximidyl-chlorkohlensäureester und 4 mg ($3,3 \times 10^{-5}$ mol) 4-Dimethylaminopyridin versetzt und unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird diese Lösung tropfenweise unter Rühren zu 10 mg ($1,5 \times 10^{-7}$ mol) Rinderserumalbumin, gelöst in 0,5 ml PBS, gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird bei 4 °C gegen 3x0,5 l PBS (0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl, pH=7,4) dialysiert und das Proteinkonjugat bei - 70 °C gelagert.

B) Herstellung des Antiserums

Die Immunisierung erfolgt in Kaninchen als Primärinjektion durch subkutane und intramuskuläre Injektion mit je 3 mg Petasin-RSA in komplettem Freund'schen Adjuvans. Die Sekundärinjektion erfolgt vier Wochen nach der

9

7. 11. 88

Primärinjektion. Nach weiteren zwei Wochen erfolgt die erste Boosterinjektion, eine zweite wird zwölf Wochen nach Immunisierungsbeginn in inkomplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt. Ca. acht Wochen nach Beginn der Immunisierung erfolgt die erste Probablutentnahme, die durch eine weitere nach vier Wochen ergänzt wird. Die Entblutung erfolgt nach 16 Wochen.

Die erhaltenen Antiseren werden einer Titerbestimmung auf spezifische anti-Petasin-Antikörper mittels Enzymimmunoassay unterworfen, bei dem Petasin-Ovalbumin an die Oberfläche von Mikrotiterplatten gebunden wird. Die zu untersuchenden Antiseren und Nullseren der Kaninchen werden nachfolgend in einer Verdünnungsreihe mit dem immobilisierten Petasin inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt durch Inkubation mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Enzym-Konjugat (Peroxidase) und anschließender visuell auswertbarer Substratreaktion.

C) Enzymimmunoassay

Petasin-Ovalbumin:

0,3 mg (8×10^{-7} mol) Petasinoxim, gelöst in 100 µl Dioxan/DMSO = 1:2 (v/v) werden mit 4 mg EDAC versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ansatz in eine Lösung von 5,5 mg ($1,2 \times 10^{-7}$ mol) Ovalbumin in 3 ml PBS gegeben, 2 h bei Raumtemperatur unter Rühren und anschließend 16 h bei 4 °C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird bei 4 °C gegen 3x0,5 l Aqua bidest. dialysiert und das Proteinkonjugat bei - 70 °C gelagert.

Beschichtung:

Petasin-Ovalbumin wird in einer Konzentration von 5 mg/l in 0,1 M Karbonatpuffer pH=9,5 (100 µl/well) adsorptiv für 16 h bei 4 °C an Polystyren-Mikrotiterplatten gebunden und danach abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit 300 µl/well Waschpuffer (PBS, 0,1% Tween 20) wird 2 h bei Raumtemperatur

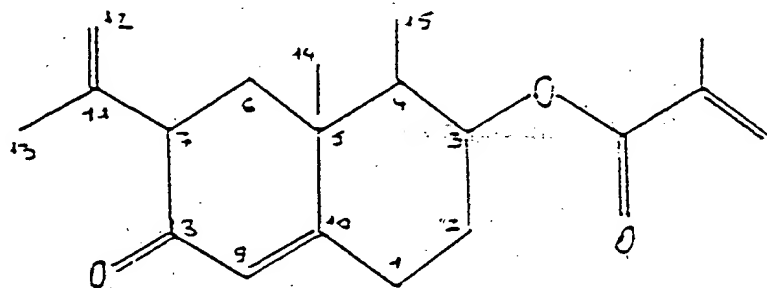
mit 150 µl/well Blockierungslösung (0,06% Gelatine, 0,02% Natriumazid in PBS) geblockt und schließlich dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Testdurchführung:

50 µl der zu testenden Serumprobe bzw. des jeweiligen Standards (1:4-Verdünnung in Probenpuffer (PBS, 1% RSA, 0,1% Tween 20, 0,01% Thiomersal)) und 50 µl einer optimierten Antiserumverdünnung in Probenpuffer werden simultan 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte dreimal mit 300 µl/well Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl anti-Kaninchen-Immunglobulin-Peroxidase-Konjugat, verdünnt in Probenpuffer, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und abermals wie oben gewaschen. Danach wird 10 min mit 100 µl einer gebrauchsfertigen Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) pro Vertiefung inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 µl/well 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die Auswertung erfolgt bei 450 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader.

Patentansprüche

1. Anti-Petasin-Antikörper zum Nachweis von Petasin oder Petasin-Protein-Konjugaten in physiologischen Flüssigkeiten, die keine Kreuzreaktivität gegenüber Derivaten, Strukturanaloge oder Metaboliten des Petasins besitzen.
2. Verfahren zur Herstellung von Anti-Petasin-Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß polyklonale oder monoklonale Antikörper durch Immunisierung von Säugetieren und/oder Vögeln mit Petasin oder Petasin-Derivaten der allgemeinen Formel I



hergestellt und die Antikörper über Hybridomtechnik oder rekombinant mit Hilfe von Antikörperbibliotheken gewonnen werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß zur Immunisierung als Petasin-Derivate Carrier-Molekül-gekoppelte Derivate eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Immunisierung Derivate des Petasins eingesetzt werden, in denen die in 8-Stellung befindliche Ketogruppe durch eine Carboxylgruppe ersetzt und mittels EDAC an Rinderserumalbumin gekoppelt ist.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Immunisierung Derivate des Petasins eingesetzt werden, in denen die in 8-Stellung befindliche Ketogruppe durch eine Carboxylgruppe ersetzt und über aktiviertes Hydrazid-Dextran an Rinderserumalbumin oder Fibrinogen gekoppelt ist.
6. Verfahren nach Anspruch 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Einführung der Carboxylgruppe mit Carboxymethylhydroxyamin unter Oximbildung erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Immunisierung Derivate des Petasins eingesetzt werden, in denen die in 11,12- Stellung befindliche Doppelbindung bromiert und an mittels Trautschem Reagenz aktiviertes Rinderserumalbumin gekoppelt ist.
8. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Immunisierung Derivate des Petasins eingesetzt werden, in denen die Angelikasäure abgespalten ist und das verbleibende Petasol über Chlorameisensäureester an einen Carrier gekoppelt ist.
9. Verwendung von Anti-Petasin-Antikörpern zum Nachweis von Petasin oder Petasin-Protein-Konjugaten in physiologischen Flüssigkeiten.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie keine Kreuzreaktivität gegenüber Derivaten, Strukturanalogen oder Metaboliten des Petasins besitzen.
11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß entweder Petasin, Petasin-Protein-Konjugate oder die Anti-Petasin-Antikörper mit einem Marker versehen sind.
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß Marker Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe, Radioisotope oder redoxaktive Verbindungen sind.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis antikörpergebundenen Petasins optisch, elektrochemisch, fluorimetrisch oder radiochemisch erfolgt.
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß ein Farbreagenz verwendet wird.
15. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis chromatographisch erfolgt.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionspartner in homologer Lösung vorliegen.
17. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß entweder die Anti-Petasin-Antikörper, das zu bestimmende Petasin oder die Petasin-Protein-Konjugate an einer feste Phase gebunden sind und zwischen den Reaktionsschritten ein Waschprozeß erfolgt.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung der Anti-Petasin-Antikörper, des zu bestimmenden Petasins oder der Petasin-Protein-Konjugate an die feste Phase adsorptiv oder nach vorhergehender chemischer Aktivierung der festen Phase kovalent erfolgt.
19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase aus Polystyren besteht.
20. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase eine unterschiedliche geometrische Form hat.
21. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Form einer Mikrotitrationsplatte, eines Röhrchens oder kugelförmige bzw. flächenförmige Gestalt aufweist.

22. Testkit zur Bestimmung von Petasin in physiologischen
Flüssigkeiten umfassend

Anti-Petasin-Antikörper

eine feste Phase, vzw. Polystyren

Waschlösung,

Verdünnungspuffer,

Enzymmarkiertes Petasin.



Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Anti-Petasin-Antikörper zum Nachweis von Petasin oder Petasin-Protein-Konjugaten in physiologischen Flüssigkeiten, die keine Kreuzreaktivität gegenüber Derivaten, Strukturanaloga oder Metaboliten des Petasins besitzen, Verfahren zu ihrer Herstellung mittels Immunisierung durch Petasin-Derivate, die vorzugsweise Carrier-Molekül-gekoppelt sind sowie ihre Verwendung und einen Testkit.